7, avenue de Scandinavie
91953 Les Ulis Cedex France
Tél : 01 69 07 94 77
Fax : 01 69 07 95 34
adv@eurobio.fr
eurobio .fr

Certifiés ISO 9001
et ISO 13485

DNAQual

PCR EN TEMPS REEL

REF **GAEDNQ00-UN10 / GAEDNQ00-UN**

33 réactions / 96 réactions

Conditions de stockage: conserver tous les réactifs à -20°C jusqu'à utilisation et après première utilisation, éviter plus de 3 cycles de congélation/décongélation

Mode d'emploi

Pour un usage de recherche uniquement.

Réactifs compatibles avec les systèmes de PCR en temps réel suivants :

Applied Biosystems Prism® 7500; qTOWER 2.2; Cepheid Smart Cycler II; Qiagen Rotor-Gene; Stratagene MX3005P; Biorad Chromo4/CFX 96; Roche LightCycler 480…

CONTENU DU KIT

Composés version 33 tests	Composés version 96 tests	Reconstitution	Stockage
Master Mix (480 µl)	Master Mix (3x 480 µl)	Prêt à l'emploi	-20°C
3 minicapsules de standard d'ADN de réference: 0,5; 1 et 2 microgrammes	3 minicapsules de standard d'ADN de réference: 0,5; 1 et 2 microgrammes	Ouvrir la minicapsule à l'aide du décapsuleur et réhydrater l'ADN (voir Protocole).	-20°C ; Après reconstitution, éviter plus de 3 cycles de congélation/décongélation
3 tubes vides pour les standards	3 tubes vides pour les standards		Après reconstitution, les standards DNA sont transférés dans ces tubes et conservés à -20°C; éviter plus de 3 cycles de congélation/décongélation
Positive control: 1 tube d'ADN dégradé: 12,5 ng/µl	Positive control: 1 tube d'ADN dégradé: 12,5 ng/µl	Prêt à l'emploi	-20°C
Eau Biologie Moléculaire	Eau Biologie Moléculaire	Prêt à l'emploi	-20°C
1 décapsuleur	1 décapsuleur	Voir Protocole-utilisable pour 50 minicapsules	RT

Matériels nécessaires non fournis: Plaque PCR temps réel, Spectrophotomètre UV pour détermination quantité d'ADN des échantillons à tester, appareil de qPCR en temps réel, micropipettes, cônes à filtres stériles, microtubes stériles, centrifugeuse de paillasse pour microtubes de type « eppendorf » (max 16 000 g).

Notes et précautions:

Centrifuger tous les tubes avant utilisation ; ne pas vortexer.
S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant.
Il est possible d'utiliser ce kit avec des ADN extraits de prélèvement en paraffine.
L'utilisation de ce produit est limitée au personnel qualifié dans les techniques de qPCR.
Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels. L'utilisation de gants est obligatoire. Des méthodes appropriées de préparation d'ADN génomique doivent être utilisées.

Limites d'utilisation:

D'éventuelles amplifications, mutations ou délétions du gène cible dans certaines pathologies peuvent affecter DNAQual (voir interprétation des résultats).
Des altérations autres que des cassures (pontages etc.) peuvent affecter la valeur de DNAQual.

SENSIBILITE ET INTERFERENCE

La quantité minimum d'ADN à tester est de 5 ng/puits. Au delà de 200 ng/puits, la précision du test diminue. La sensibilité est donc considérablement supérieure à un test en SybGreen® ou un gel d'agarose, avantageux pour des échantillons rares ou dont la quantité de matériel est limitée.
Ce test ne subit pas d'interférence si l'ADN génomique est contaminé par de l'ADN bactérien, de l'ARN humain ou du phénol.

PRINCIPE

Ce kit permet de quantifier la qualité d'un ADN génomique en mesurant le nombre de copies d'un gène cible versus un gène calibrateur universel dans n'importe quel échantillon d'ADN génomique humain, par PCR quantitative (qPCR). Cette méthode utilise les logiciels de quantification des machines qPCR classiques (le système Biorad CFX est donné en exemple dans cette fiche, mais peut-être adapté à toute machine de qPCR). Les deux gènes: calibrateur et cible sont mesurés à l'aide de 2 sondes spécifiques de couleurs fluorescente différentes, mises en duplex : Texas Red (excitation : λ=586 nm) pour le calibrateur et VIC (excitation : λ= 538 nm ; equivalent HEX, Yakima Yellow) pour le gène cible. Tous les résultats sont exprimés par rapport à un ADN génomique de référence de haute qualité qui ne contient qu'une copie du gène cible et du gène calibrateur.

Une gamme standard de cet ADN de référence (3 triplicata à 50, 25 et 12,5 ng/µl chacun) permettra d'affiner les paramètres de la qPCR (obtention des réglages des gains permettant d'amplifier artificiellement la mesure d'une fluorescence sur certaines machines) pour la machine de qPCR disponible au laboratoire. Les gains seront réglés pour que le rapport des 2 fluorescences Cible/Calibrateur soit égal à 1 pour 50, 25 et 12,5 ng/µl de l'ADN de référence. Le R^2 et les efficacités (E) de PCR sont réglés idéalement (R^2 au plus proche de 1 et Efficacité (E) des deux sondes les plus voisines possibles et de 100 %, la pente de la droite la plus proche de -3,3).

Un contrôle négatif (eau) et un positive control (ADN dégradé) seront également inclus.

Le logiciel calcule le rapport de fluorescence du gène cible sur fluorescence du calibrateur. La méthode de delta de delta de Ct ($\Delta\Delta$Ct) des logiciels de qPCR est utilisée pour les calculs. Les résultats seront automatiquement transformés en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et exprimés en histogrammes automatisés. Le nombre de copies de gène cible est exprimé par rapport à cet ADN de référence qui est indiqué comme contenant 12,5 ; 25 ou 50 ng/µl de gène cible. Le rapport est égal à 1 dans cet ADN. Dans le cas où le logiciel ne dispose pas de la méthode du $\Delta\Delta$Ct, calculer les quantités pour chaque gène à partir des Ct et faire le rapport.
Les valeurs individuelles de Ct donnent aussi une indication de la quantité d'ADN amplifiable dans l'échantillon testé par qPCR en comparant à la courbe standard.

PROTOCOLE

1-Réalisation de la gamme standard d'ADN:

La gamme correspond à une cascade de dilution de l'ADN de référence : 50, 25 et 12,5 ng/µl. Ces ADNs sont à préparer en décapsulant les minicapsules à l'aide du décapsuleur. **Un décapsuleur pour les standards est fourni à coté des réactifs. Il est utilisable pour au moins 50 capsules.** Pour récupérer l'ADN d'une minicapsule, placer celle-ci dans le support gris. Le code Data matrice-2D doit se trouver à la base. Couvrir le support gris avec le couvercle rouge. En tenant le support gris, tourner le couvercle dans le sens des aiguilles d'une montre jusqu'en buttée. Récupérer la minicapsule et procéder à la réhydratation. Pour se faire, ajouter 40 microlitres d'eau Biologie Moléculaire, laisser

reposer 10 minutes et effectuer 10 pipetage/refoulement **avec un cône de P20**, puis transférer le contenu de la minicapsule (avec cône de P20 : 2x20 µl) dans le tube marqué de la concentration correspondante avec le code couleur ci-dessous.

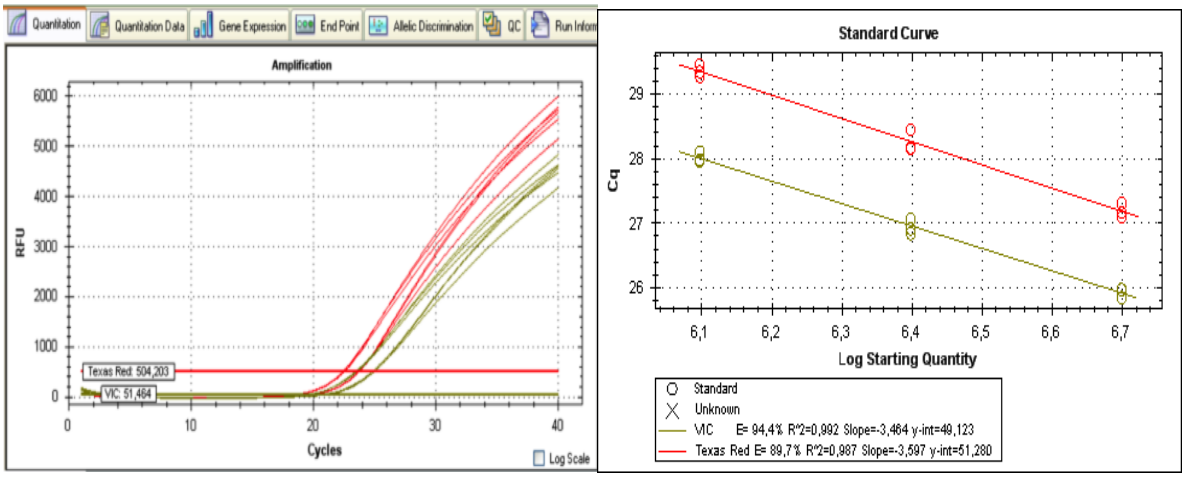
Code couleur des minicapsules et tubes:

50 ng/µl: rouge

25 ng/µl : jaune

12,5 ng/µl : bleu

Le logiciel établit la droite standard et les seuils de manière automatique. Cependant il est de vigilance de l'utilisateur de remarquer si un point peut être incohérent et de l'exclure, ainsi que de régler les seuils manuellement si nécessaire. Chaque point de gamme est réalisé en triplicata. Ceci permet de s'assurer des paramètres d'efficacité de la qPCR : les gains de fluorescence et seuils sont réglés pour obtenir une courbe standard présentant des paramètres d'efficacité PCR optimum (pente la plus proche de -3,3 et R^2 le plus proche de 1). Les efficacités et les pentes des 2 courbes doivent être les plus proches possibles pour des résultats précis. Cette courbe standard est enregistrée dans la machine. Une fois ces constantes de gains choisies, il faut toujours reprendre les mêmes pour les expériences ultérieures. Le même protocole PCR qu'en 2- & 3- s'applique.



Pour chaque expérience nouvelle réalisée, au minimum 2 points (par exemple 25 et 12,5 ng/µl) de la gamme étalon ainsi qu'un contrôle négatif (eau) et un positive control (12,5 ng/µl ADN dégradé fourni) seront toujours réalisés en triplicata. Ils servent de standards internes aux expériences et permettent la comparaison des résultats obtenus de manipulation en manipulation. Les rapports de fluorescence sont voisins de 1.

2-**Préparation de la plaque : volume final de 15 µl/puits**

Le mélange réactionnel doit être préparé selon le tableau ci-après. Noter qu'il est recommandé que le test soit réalisé sur 75 ng d'ADN, mais cette quantité peut être diminuée jusqu'à 5 ng. Ne pas excéder en revanche 300 ng, au delà duquel la qPCR ne serait plus linéaire et les résultats imprécis. Cette quantité peut être déterminée au préalable par OD à 260 nm, soit utiliser un volume constant pour une série d'échantillon dont la concentration ne varie pas plus d'un facteur 10 entre eux (exemple : entre 5 à 50 ng).

Composés	**Volume (pour un puits)**	**Concentration finale**
Master Mix	12 µl	1X
Echantillon ADN	3 µl	75 ng
Volume final	15 µl	

Notes :

- Faire des triplicatas pour les différents échantillons à tester assure une meilleure précision dans la mesure mais des duplicata peuvent également être utilisés.
- Mettre 12 µl de Master Mix dans tous les puits puis ajouter l'ADN à tester.
- Sceller la plaque 96 puits avec un film adhésif
- Le volume d'ADN utilisé peut être de 1 ou 2 µl (et de Mastermix 14 et 13 µl, respectivement) mais cela peut conduire à des imprécisions de pipettages. La gamme étalon doit être réalisée avec les mêmes volumes que les échantillons.

3-Programme PCR :

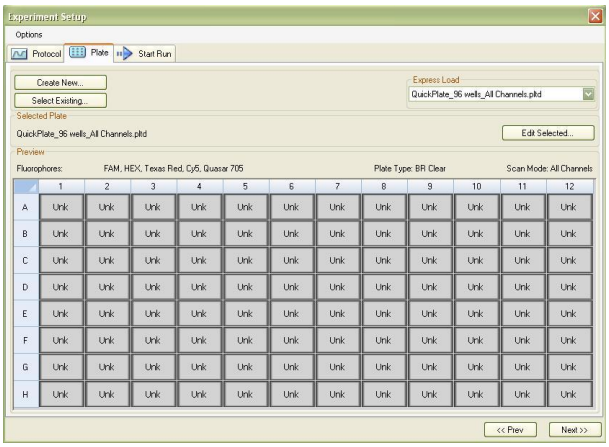
Dénaturation initiale : 3 min à 95°C
40 Cycles PCR : 10 sec 95°C
30 sec 63°C
30 sec 72° C (+ collecte et analyse des données à cette étape du cycle)

4-Expression des résultats obtenus :

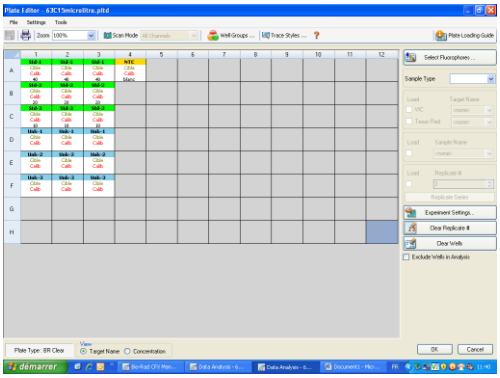
Ils sont exprimés en histogrammes avec en abscisse le nom de l'échantillon et en ordonnée le ratio entre le nombre de copies du gène cible et du gène calibrateur dans l'échantillon, normalisé par rapport à ce ratio dans l'ADN de référence (Normalized fold expression).
Les points de gamme standard servent de référence interne. Le ratio des fluorescences cible/calibrateur du standard est ainsi égal à 1. Pour qu'un run soit valide, le contrôle négatif (eau) ne doit pas donner d'amplification et le positive control (ADN dégradé) doit présenter un ratio d'expression normalisée inférieur ou égal à 0,6. Pour chaque échantillon test, ce ratio est calculé automatiquement par la machine.
Pour comparer des résultats de plaque à plaque, entrer manuellement les mêmes valeurs de seuils que la plaque mère.

Exemple de procédure à suivre lors de la création d'une plaque pour test DNAQUAL sur Bio-Rad CFX Manager. Pour toute autre machine, se référer à la programmation de la machine et adapter le protocole décrit ci-dessous

-Edition du protocole de PCR selon les conditions de BioRad
-Edition de la plaque



- *Cliquez sur l'onglet 'Plate', sélectionnez ' Create New…'*
- *Sélectionnez les puits Standards de la plaque 96 puits*
- *Cliquez sur 'Sample Type' pour les indiquer en tant que 'standard'*
- *Cliquez sur 'Select Fluorophores…' pour sélectionner les fluorophores utilisés*
- *Cochez 'Texas Red' pour le gène calibrateur et 'VIC' pour le gène cible. Noter le nom 'Calib' pour Texas Red et 'Cible' pour VIC*
- *Pour chacun d'entre eux, indiquez la concentration dans 'concentration' : 50, 25 et 12,5 ng/µl d'ADN (généralement, 2 triplicata à 25 et 12,5 ng/µl sont suffisants une fois la gamme standard établie).*
- *Exemple : pour 25 ng/µl, entrez 2,5^{E}+06.*
- *Sélectionner un puits avec de l'eau et indiquer NTC. A la fin de l'expérience celui-ci sera exclu de l'analyse ('exclude well from analysis' car sa valeur est à 0 : N/A). Procéder de la même manière si des échantillons testés sont indiqués N/A pour obtenir un histogramme de gene expression. Pour la première qPCR vérifiant la courbe standard, il n'y a pas d'autres échantillons.*
- *Pour les expériences testant des échantillons inconnus, sélectionnez ensuite les puits des échantillons à tester y compris le positive control (ADN dégradé fourni).*
- *Sélectionnez les 3 puits réunissant la même condition.*
- *Indiquez les échantillons à tester en tant que 'Unknown' dans 'Sample Type'*
- *Faîtes de même pour les fluorophores : cochez 'Texas Red' pour le gène calibrateur et 'VIC' pour le gène cible. Noter le nom Calib pour Texas Red et Cible pour VIC*
- *Indiquez le nom de l'échantillon dans 'Sample Name' et tapez 'Entrer. La moyenne de 3 échantillons de même nom sera calculée.*
- *N'oubliez pas de cocher, ou taper 'Entrer' sinon le changement ne se fait pas.*
  Les échantillons apparaissent désormais sur le plan de plaque.



- *Cliquez sur 'Experiment Settings- target' et cochez 'Calib' comme Référence*

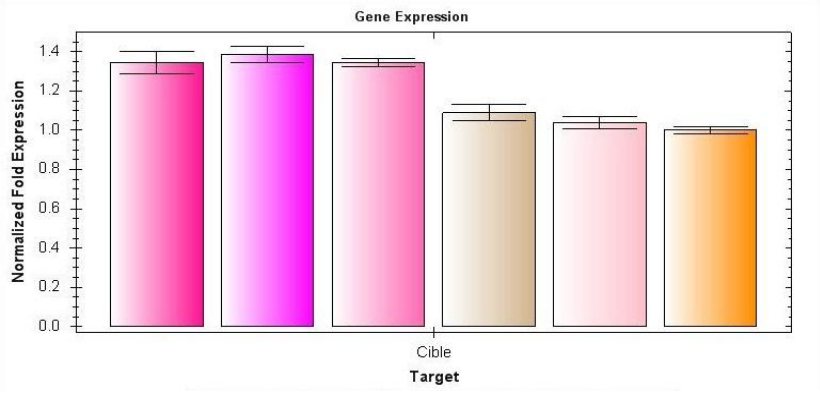
- *Dans 'Settings', n'oubliez pas d'indiquez le type de votre plaque selon qu'elle soit blanche ou transparente et le volume réactionnel : 15 µl ou plus si c'est le cas*
- *Dans 'Experiment Settings- samples', choisir le nom du point standard 25 ng/µl (toujours inclus dans une expérience) pour la normalisation par rapport à un ADN de haute qualité et le calcul de la dégradation de l'ADN des échantillons par rapport à celui-ci.*
- *Cliquez sur 'Ok', enregistrez la plaque.*
- *Cliquez sur 'Start Run'*
- *Indiquez le nom de fichier dans lequel l'enregistrer.*
- *A noter que les changements de noms et autres paramètres peuvent être fait en fin de run en cliquant sur View/Edit plate.*

-Résultats

Pour obtenir un graphe de gene expression, il faut exclure de l'analyse tous les échantillons ayant un valeur N/A. Utiliser les paramètres suivants:
Analysis Mode: Baseline Subtracted Curve Fit
Ct Determination: Single Threshold
Analysis Mode: Normalized expression (ΔΔC(t))
Chart Data: Relative to zero
Baseline Method per Fluorophore:
VIC: Auto Calculated
Texas Red: Auto Calculated
Threshold Setting per Fluorophore:
VIC: 51,46, User Defined
Texas Red: 504,20, User Defined
Scaling options: Unscaled
Chart Error: ±1,0

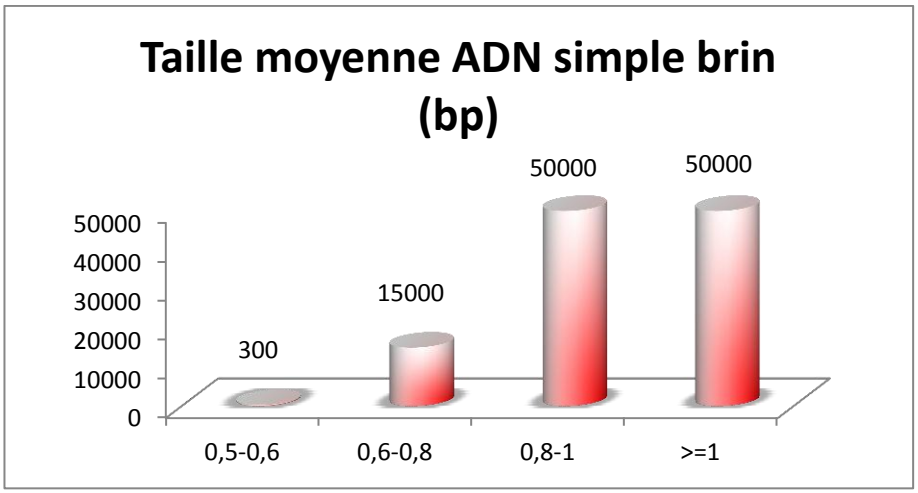
Voir Protocole 1- pour l'optimisation des courbes standard. Pour comparer des résultats de plaque à plaque, entrer manuellement les mêmes valeurs de seuils que la plaque mère.

<u>Exemple de résultats:</u>



INTERPRETATION DES RESULTATS

Sur l'histogramme des résultats de « Normalized gene expression », la valeur DNAQual est obtenue. Les valeurs individuelles de Ct, obtenues à partir du logiciel de qPCR, donnent aussi une indication de la quantité d'ADN amplifiable par qPCR en comparant à la courbe standard.
Une relation entre la valeur DNAQual et la taille moyenne attendue de fragments d'ADNs présents dans un échantillon a pu être établie. Pour une application nécessitant une taille supérieure à la taille moyenne, il est recommandé d'augmenter la quantité d'ADN.



Sachant que tout échantillon est un mélange de fragments de plusieurs tailles, la distribution moyenne de ces tailles en fonction de DNAQual est visible sur le Tableau ci-dessous.

DNAQual	Taille de 50 % des fragments (bp) < taille moyenne	Taille de 50 % des fragments (bp) > taille moyenne
0,5-0,6	100-300	300-1500
0,6-0,8	500-15000	15000-100000
0,8-1	10000-50000	50000-150000
≥ 1	10000-50000	50000-200000

Pour un DNAQual <0,5, l'ADN est très fortement dégradé, mais peut toutefois convenir pour certaines applications en augmentant la quantité.

Notes :
Pour un DNAQual > 1,5, il est vraisemblable que le gène cible soit amplifié dans cet échantillon et DNAQual n'est pas utilisable de façon fiable pour évaluer la qualité de l'ADN. D'éventuelles mutations ou délétions du gène cible dans certaines pathologies peuvent conduire à des valeurs de DNAQual <1 sans que l'ADN soit dégradé.

DNAQual

REAL TIME PCR

REF **GAEDNQ00-UN10 / GAEDNQ00-UN**

Σ **33 reactions / 96 reactions**

STORAGE: keep all reagents at -20°C before opening. After opening, avoid more than 3 freezing/defrosting cycles

Instructions for use

Research Use Only

Reagents compatible with the following real time PCR equipments:
Applied Biosystems Prism® 7500; qTOWER 2.2; Cepheid Smart Cycler II; Qiagen Rotor-Gene; Stratagene MX3005P; Biorad Chromo4/CFX 96; Roche LightCycler 480…

7, avenue de Scandinavie
91953 Les Ulis Cedex France
Tél : 01 69 07 94 77
Fax : 01 69 07 95 34
adv@eurobio.fr
eurobio .fr

Certifiés ISO 9001
et ISO 13485

CONTENT OF THE KIT

Reagents for 33 reactions	Reagents for 96 reactions	Reconstitution	Storage
Master Mix (480 µl)	Master Mix (3x 480 µl)	Ready to use	-20°C
3 minicapsules of standard reference DNA: 0,5; 1 and 2 micrograms	3 minicapsules of standard reference DNA: 0,5; 1 and 2 micrograms	Open the minicapsule with the shell opener and rehydrate DNA (see Protocol).	-20°C ; After reconstitution, avoid more than 3 freezing/defrosting cycles
3 empty tubes for standards	3 empty tubes for standards		After reconstitution, standard DNA are transfered into these tubes and kept at -20°C; avoid more than 3 freezing/defrosting cycles
Positive control: 1 tube of Degraded DNA: 12,5 ng/µl	Positive control: 1 tube of Degraded DNA: 12,5 ng/µl	Ready to use	-20°C
Molecular Biology water	Molecular Biology water	Ready to use	-20°C
1 shell opener	1 shell opener	See Protocol-for opening 50 minicapsules	RT

Materials required and not provided: PCR plate, UV Spectrophotometer for measuring DNA concentration of samples to be tested, qPCR machine, pipets, tips with filters, centrifuge for microtubes (max 16 000 g)

Notes and caution:

Centrifuge all tubes before use; do not vortex the probes.

Ensure that all instruments are installed, calibrated and maintained according to manufacturers recommendations.

It is possible to use this kit with DNA extracted from paraffin blocks.

Use of this product is limited to qualified personnel in the techniques of qPCR.

Extreme care should be taken to preserve the purity of the components of the kit and reaction setups. Use gloves. Appropriate methods for DNA preparation must be used.

Limitations for use:

Some amplifications, mutations or deletions of the target gene in some pathologies can affect DNAQual (see interpretation of results). Alterations other than DNA breaks can affect DNAQual.

SENSITIVITY AND INTERFERENCE

The minimum amount of DNA to test is 5 ng/well. For more than 200 ng/well, the accuracy of the test decreases. The sensitivity is therefore higher than a SybGreen® test or agarose gel, advantageous for rare samples for which the amount of material is limited.

There is no interference if bacterial DNA, human RNA or phenol contaminates genomic DNA.

PRINCIPLE

This kit allows assessing quantitatively the quality of DNA by quantifying the number of copies of a target gene compared to a calibrator gene in any human DNA sample by qPCR. This method uses quantification software existing on qPCR machines (The Biorad CFX manager software is given as an example in this technical sheet, but can be adapted to any qPCR machine). The 2 genes (target and calibrator) are measured with 2 specific probes carrying a specific fluorophore, in duplex: Texas Red (excitation: λ=586 nm) for the calibrator and VIC (excitation : λ= 538 nm ; equivalent HEX, Yakima Yellow) for the target gene. The results are expressed by comparison with a reference DNA of high quality.

A standard curve with the reference DNA (in triplicates for 50, 25 and 12,5 ng) first allows to refine the qPCR parameters (gains that allow artificially amplify the fluorescence on some qPCR machines) on the qPCR machine available in your laboratory. Gains will be set so that the ratio between the 2 fluorescence intensities (target/calibrator) equals 1 for 50, 25 and 12,5 ng/µl of reference DNA. The R^2 and efficiency (E) of PCR must be set ideally (R^2 as close as possible to 1 and E for each probe as close as possible to 100 % and close to each other, the slope as close as possible to -3,3).

A negative control (water) and a positive control (Degraded DNA) are also included.

The software calculates the ratio of fluorescence of the target gene over the calibrator. The delta of delta of Ct ($\Delta\Delta$Ct) method of qPCR software is used for calculation. Results are automatically transformed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ and displayed automatically by histograms. The number of copies of the reference gene in a sample is expressed compared to the reference DNA indicated as containing either 12,5; 25 or 50 ng/µl. The ratio is 1 in this reference DNA. If the software does not include the $\Delta\Delta$Ct method, calculate the amounts for each gene from the Ct values and calculate the ratio.

The individual values of Ct also give an indication of the amount of amplifiable DNA in a sample by qPCR by comparison with the standard curve.

PROTOCOL

1-Standard curve of DNA:

The standard curve corresponds to serial dilutions of reference DNA: 50, 25 and 12,5 ng/µl. These DNAs are prepared by opening the minicapsules using the shell opener. **One shell opener for these standards is provided and is usable for opening 50 minicapsules.** To recover DNA from a minicapsule, place it in the grey holding base. The Data 2D matrix code must face down. Cover the capsule-holding base with the red lid. While holding the grey base, turn the lid clockwise until it stops. Recover the opened minicapsule and proceed to rehydration: add 40 microliters of Molecular Biology water, let it rest for 10 minutes and pipet up and down 10 times with **a P20 filter tip**, then transfer the content of the minicapsule with the P20 (2x20 microliters) into the tube labeled with the corresponding concentration and with the color code below.

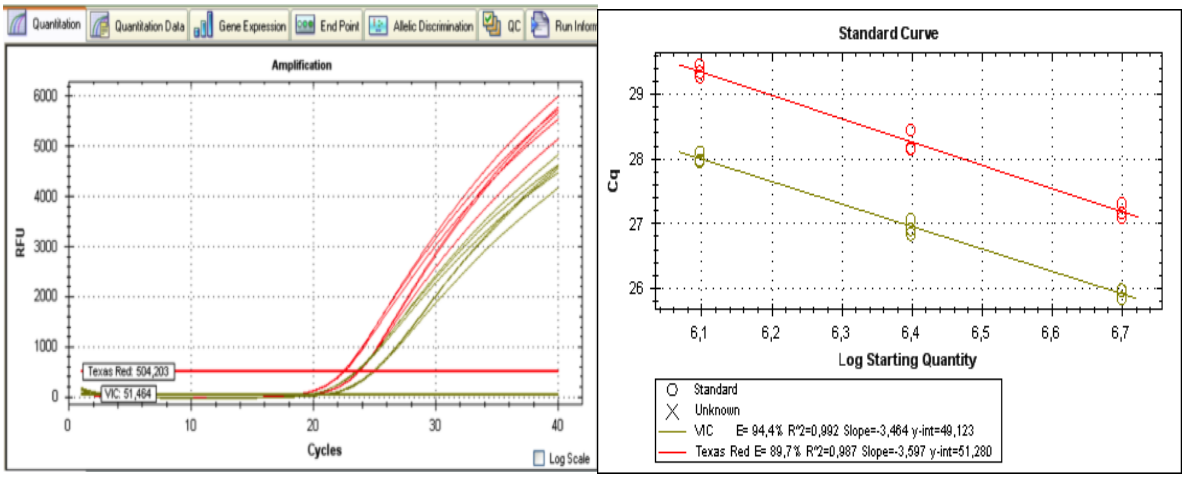
Color Code for minicapsules and tubes:

50 ng/µl: red

25 ng/µl : yellow

12,5 ng/µl : blue

The software establishes a standard curve and thresholds automatically. Nevertheless, the user must notice of a point is incoherent and exclude it, as well as adjust the threshold manually. Each concentration of standards is tested in triplicate. This ensures that the R^2 and efficiency (E) of PCR are set ideally (R^2 as close as possible to 1 and E for each probe as close as possible to 100 % and close to each other, the slope as close as possible to -3,3). The standard curve is recorded on the machine; so that if more than one plate is processed the same gains are used. The same protocol as in 2- & 3- applies.



For each new experiment, at least 2 concentrations (for instance 25 and 12,5 ng/µl) of the standard curve as well as a negative control (water) and a positive control (12,5 ng/µl degraded DNA provided) are always performed in triplicate. These are used as internal standard and allow comparisons between experiments. The fluorescence ratios are close to 1.

2- **Preparation of the plate: final volume 15 µl/well**

The PCR mix should be prepared according to the table bellow. It is recommended to perform the test on 75 ng of DNA per well, but this amount can be decreased to 5 ng. Do not exceed however 300 ng, as results may not be accurate. This amount can be determined first by OD measurement at 260 nm, or the same volume can be used for a series of samples for which the concentration does not vary more than 10 times between samples (example: between 5 and 50 ng).

Reagents	**Volume (for 1 well)**	**Final Concentration**
Master Mix	12 µl	1X
DNA sample	3 µl	75 ng
Final Volume	15 µl	

Notes :

- Making triplicates for the different samples leads to higher accuracy, but duplicates can also be performed.
- Dispense 12 µl in the wells and add DNA.
- Seal the plate with an adhesive film.
- The volume of DNA used can be 1 or 2 µl (and Mastermix 14 et 13 µl, respectively) but these lower volumes can increase variations. The standard curve must be performed with the same volume of DNA standards as samples.

3- PCR Program:

Initial denaturation: 3 min at 95°C
40 PCR Cycles: 10 sec at 95°C
30 sec at 63°C
30 sec at 72° C (+ collection and analysis of data)

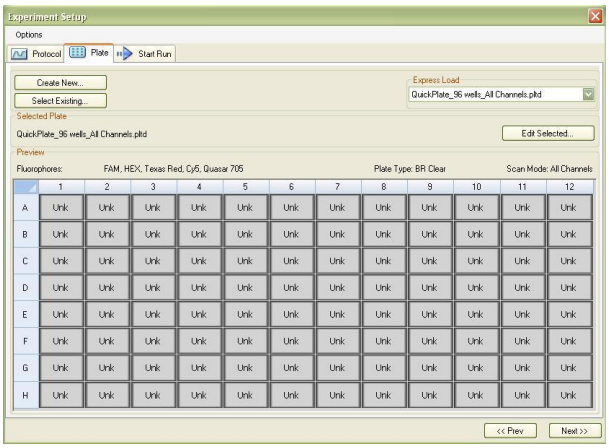
4-Results:

They are displayed as histograms with on the x-axis the name of the sample and on the y-axis the ratio between the number of target gene and calibrator, normalized to the ratio in the reference DNA (of high quality) (normalized fold expression).
The points of the standard curve are used as internal reference. The ratio of fluorescence target/calibrator of the standard equals 1, by using the $\Delta\Delta$Ct method. For each sample, the machine calculates this ratio automatically. For a run to be valid, the negative control must not result in any signal and the positive control (degraded DNA) must have a normalized expression equal or below 0,6.

Example of procedure to create a plate for DNAQUAL on Biorad CFX Manager after establishment of the standard curve (1-). For other PCR machines, refer to the corresponding programming and adapt from the protocol described below.

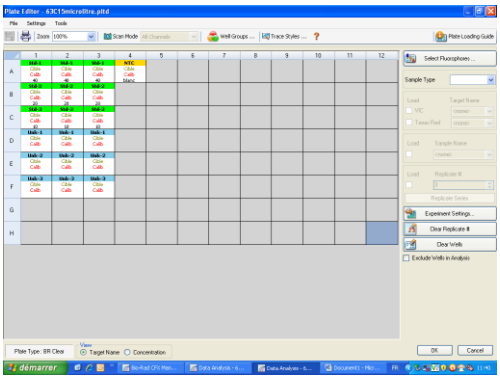
-Editing of the protocol according to the BioRad system

-Editing of the plate



- *Select 'Plate', Select ' Create New…'*
- *Select Standard wells of the 96 well plate*

- *Select 'Sample Type' and label them as 'standard'*
- *Select 'Select Fluorophores…' to choose the fluorophores*
- *Select 'Texas Red' for the calibrator gene and 'VIC' for the target gene. Write the 'Calib' for Texas Red and 'Target' for VIC*
- *For each of them, enter the concentration : 50, 25 and 12,5 ng/µl of DNA (generally, 2 triplicates of 50, 25 or 12,5 ng/µl are sufficient per experiment once the standard curve has been established) ; for example, for 25 ng/µl, enter 2,5^{E}+06.*
- *Select one well for water and select it as NTC. At the end of the experiment, this well will be excluded from the analysis (using 'exclude well from analysis' because its value is 0, indicated N/A). All samples with N/A must be excluded in order to obtain a histogram of gene expression for the valid samples. For the first experiment verifying the standard curve there are no other samples.*
- *For experiments testing unknown samples, select the wells of the samples including the positive control (degraded DNA).*
- *Select the 3 wells as the same condition*
- *Label them as 'Unknown' in 'Sample Type'*
- *Select 'Texas Red' for the calibrator gene and 'VIC' for the target gene.*
- *Indicate the name of the sample in 'Sample Name' and press 'Enter'*
- *Click on 'Replicate series' and choose 1 for the first series of replicates, 2 for the second etc.*
- *Choose 3 for the number of replicates in horizontal.*
- *Do not forget to press on 'Enter' for the change to be validated*
  The plate then appears as below



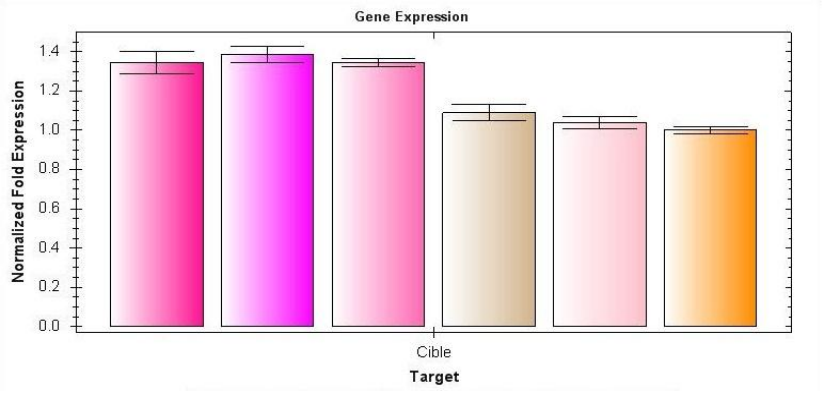
- *Select 'Experiments Settings-target' and select 'Calib' as Reference*
- *Then, in 'Settings', indicate the type of plate (white or transparent) and the volume (15 µl or more if it is the case).*
- *For 'Experiment Settings- samples', choose the name of the 50, 25 or 12,5 ng/µl standard DNA (included in each experiment) for normalization to the high quality DNA and calculation of degradation of DNA samples.*
- *Select 'Ok', save the plate.*
- *Select 'Start Run'*
- *Indicate the name of the file to save it as.*
- *Note that any changes in the plate layout or for calculations can be performed after the run by choosing view/edit plate.*

-Results

To obtain the gene expression graph, all samples displaying N/A must be excluded from the analysis
The parameters below must be chosen :
Analysis Mode: Baseline Subtracted Curve Fit
Ct Determination: Single Threshold
Analysis Mode: Normalized expression (ΔΔC(t))
Chart Data: Relative to zero
Baseline Method per Fluorophore:
VIC: Auto Calculated
Texas Red: Auto Calculated
Threshold Setting per Fluorophore:
VIC: 51,46, User Defined
Texas Red: 504,20, User Defined
Scaling options: Unscaled
Chart Error: ±1,0

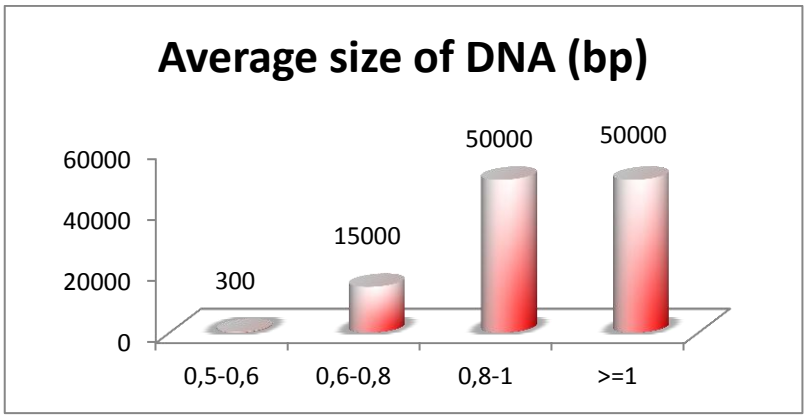
See Protocol 1- for optimizing the standard curve. To compare results from plate to plate, manually enter the same threshold values as the mother plate.

Example of results:



INTERPRETATION of RESULTS

On the histogram « Normalized gene expression », DNAQual values are displayed. The individual Ct values, obtained from the qPCR software, also give an indication of the amount of amplifiable DNA by qPCR, by comparison to the standard curve.
A relationship between DNAQual value and the average size of DNA fragments present in a sample has been established. For an application requiring higher size fragments, it is recommended to increase the amount of DNA.



In each sample a mixture of different sizes of DNA fragments is present. The distribution of theses sizes for a given value of DNAQual is presented in the table below.

DNAQual	Size of 50 % of fragments (bp) < average size	Size of 50 % of fragments (bp) > average size
0,5-0,6	100-300	300-1500
0,6-0,8	500-15000	15000-100000
0,8-1	10000-50000	50000-150000
≥ 1	10000-50000	50000-200000

For a DNAQual <0,5, DNA is very degraded, but may be adapted to some applications by increasing the amount of DNA.

Notes :
For a DNAQual > 1,5, it is likely that the target gene is amplified in this sample and DNAQual may not be useable with accuracy to evaluate the quality of its DNA. Some deletions or mutations in the target gene may lead to DNAQual values <1 in absence of DNA degradation.